

Badania genetyczne w diagnostyce hemofilii B

Genetic testing in hemophilia B diagnostics

Edyta Odnoczko¹, Jerzy Windyga^{1, 2}

¹Zakład Hemostazy i Chorób Metabolicznych, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

²Klinika Zaburzeń Hemostazy i Chorób Wewnętrznych, Instytut Hematologii, Warszawa

Streszczenie

Hemofilia B jest uwarunkowaną genetycznie skazą krwotoczną, spowodowaną brakiem lub zmniejszeniem syntezy osocznego czynnika krzepnięcia IX (fIX). Powszechnie chorobę tę rozpoznaje się na podstawie wyników badań krzepnięcia osocza, przede wszystkim mierząc aktywność koagulacyjną fIX. Jednak badania molekularne genu czynnika IX powinny stanowić integralną część nowoczesnej diagnostyki hemofilii B, ponieważ identyfikacja mutacji sprawczej umożliwia wstępną ocenę ryzyka rozwoju alloprzeciwciał (inhibitora) wobec fIX oraz postawienie pewnej diagnozy stanu nosicielstwa hemofilii B. W niniejszym artykule przedstawiono strategię postępowania w diagnostyce molekularnej hemofilii B wraz z omówieniem najczęściej stosowanych technik molekularnych.

Słowa kluczowe: hemofilia B, genetyka, F9, mutacja sprawcza, hemofilia B Leyden

Hematologia 2015; 6, 3: 264–270

Abstract

Hemophilia B is genetically determined bleeding disorder caused by lack of or decrease plasma synthesis of coagulation factor IX (fIX). Commonly this disease is recognized based on the plasma clotting test results, in particular by measuring fIX coagulation activity. Molecular testing of factor IX gene should represent an integral part of modern hemophilia B diagnostics, because identification of the causative hemophilia B mutation gives the opportunity to preliminary assess the risk of fIX alloantibodies (inhibitor) formation and a clear-cut diagnosis of hemophilia B carrier status. This paper outlines the strategy for molecular diagnostics in hemophilia B including discussion of the most widely used molecular techniques.

Key words: hemophilia B, genetics, F9, causative mutation, hemophilia B Leyden

Hematologia 2015; 6, 3: 264–270

Wprowadzenie

Hemofilia B (Hem B) jest wrodzoną skazą krwotoczną, spowodowaną brakiem lub zmniejszeniem syntezy osocznego czynnika krzepnięcia IX (fIX, *factor IX*). Po raz pierwszy niedobór fIX opisano w 1952 roku u chłopca o nazwisku Christmas,

dlatego dawniej Hem B nazywano chorobą Christmasa (*Christmas disease*) [1]. Hemofilia B jest także określana mianem „choroby królewskiej”, gdyż występowała w dynastiach panujących na tronach Anglii, Rosji, Niemczech oraz Hiszpanii. Wśród nich najsłynniejszym chorym na hemofilię był carewicz Aleksy Mikołajewicz Romanow — syn ostatniego

Adres do korespondencji: Edyta Odnoczko, Zakład Hemostazy i Chorób Metabolicznych, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Indiry Gandhi 14, 02-776 Warszawa, tel. 22 349 65 48, faks: 22 349 61 59, e-mail: eodnoczko@ihit.waw.pl

cara Rosji Mikołaja II i potomek angielskiej królowej Wiktorii (najstłniejszej nosicielki hemofilii).

Przeciętną częstość występowania Hem B szacuje się na 1/30 000 męskich noworodków, a zatem około 6-krotnie rzadziej niż hemofilii A (Hem A). W Polsce, na podstawie wyników badania epidemiologicznego przeprowadzonego w 2004 roku, częstość występowania Hem A i Hem B łącznie oszacowano na 1/5600 mężczyzn [2]. W Ogólnopolskim Rejestrze Wrodzonych Skaz Krwotocznych prowadzonym w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii (IHT) w Warszawie obecnie (31.07.2015 r.) znajduje się blisko 400 chorych na Hem B, przy czym ciężka postać choroby występuje u niemal 50% pacjentów.

Hemofilia B dziedziczy się w sposób recesywny sprzężony z płcią, co sprawia, że objawy skazy krwotocznej występują głównie u mężczyzn, zaś kobiety są nosicielkami. W piśmiennictwie niezwykle rzadko są opisywane przypadki kobiet z objawową Hem B, która może być wynikiem nieprawidłowej inaktywacji chromosomu płciowego X (skrajnej lionizacji) bądź monosomii, translokacji lub delecji dużego fragmentu chromosomu X (obejmującej *locus* Xq27), a także może wystąpić u córki urodzonej ze związku nosicielki Hem B i chorego na Hem B [3–5]. Ryzyko urodzenia przez nosicielkę Hem B syna lub córki obarczonych genem hemofilii jest podobne i wynosi 50% ($p = 0,5$).

Budowa i rola fIX w hemostazie

Czynnik IX jest jednołańcuchową glikoproteiną osocza, syntetyzowaną w wątrobie z udziałem witaminy K. Białko to występuje w krwiobiegu w stężeniu 3–5 mg/l w postaci nieaktywnego proenzymu — zymogenu proteazy serynowej [6]. Prekursor fIX jest zbudowany z 461 aminokwasów (aa) o łącznej masie cząsteczkowej blisko 57 kDa. Proces potranslacyjnej modyfikacji cząsteczki fIX, poprzedzonej odszczepieniem 28-aminokwasowej (aa) sekwencji sygnałowej oraz 18 aa propeptydu, prowadzi do powstania dojrzałej formy zbudowanej z 415 aa.

Do aktywacji zymogenu fIX w osoczu dochodzi pod wpływem aktywnego fXI (fXIa) bądź kompleksu czynnika tkankowego z aktywnym czynnikiem VII w wyniku hydrolizy wiązań peptydowych w pozycji Arg192 oraz Arg226 [6]. Aktywny fIX w krwiobiegu występuje w postaci dwułańcuchowego polipeptydu, złożonego z łańcucha lekkiego (145 aa) i ciężkiego (235 aa). Podjednostkę lekką (N') budują domeny: jedna bogata w kwas gamma-karboksyglutaminowy (GLA, *gamma-carboxyglutamic acid-rich domain*) oraz dwie zawierające motywy sekwencji

aminokwasowej występujące w sekwencji nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF-1, -2, *epidermal growth factor-like domain* 1, 2). Podjednostkę ciężką (C') buduje domena zawierająca serynę w centrum aktywnym enzymu (SP, *serine protease*) [6]. Główna rola fIX w procesie krzepnięcia krwi polega na współtworzeniu wewnątrzpochoźnego kompleksu tenazy [7]. Przyczyną nadmiernej skłonności do krwawień u osób z niedoborem lub brakiem fIX jest niewystarczająca generacja trombinu wynikająca z upośledzonej aktywacji czynnika krzepnięcia X do Xa.

Badania osoczowe w diagnostyce Hem B

Hemofilię B zwykle rozpoznaje się na podstawie wyników osoczowych testów hemostazy. W badaniach laboratoryjnych obserwuje się wydłużenie czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT, *activated partial thromboplastin time*) przy prawidłowych wartościach czasu protrombinowego (PT, *prothrombin time*) i czasu trombinowego (TT, *thrombin time*) oraz zmniejszoną aktywność koagulacyjną czynnika IX (fIX:C). Nasilenie objawów skazy krwotocznej jest podyktowane stopniem niedoboru fIX w osoczu. Wyróżnia się trzy postacie Hem B: ciężką (fIX:C < 1 j.m./dl), umiarkowaną (fIX:C 1–5 j.m./dl) oraz łagodną (fIX:C > 5–40 j.m./dl) [8].

U większości nosicieli Hem B w badaniach koagulacyjnych obserwuje się prawidłową wartość fIX:C. W takim przypadku badanie fIX:C w osoczu jest testem niewystarczającym, by wykluczyć nosicielstwo Hem B. U pozostałych nosicieli Hem B wartość fIX:C jest zwykle zmniejszona o połowę, co wystarcza do sprawnego funkcjonowania hemostazy. Skaza krwotoczna może się natomiast ujawnić w grupie 10–15% nosicieli, u których wyjściowa aktywność fIX:C w osoczu wynosi poniżej 30 j.m./dl [9, 10]. Warto dodać, że u zdrowych noworodków aktywność fIX:C jest fizjologicznie zmniejszona, a APTT może być wydłużony. Tylko wtedy, gdy aktywność fIX:C u noworodka wynosi poniżej 1 j.m./dl, rozpoznanie ciężkiej Hem B jest pewne. W pozostałych przypadkach ostateczną decyzję o rozpoznaniu bądź wykluczeniu Hem B można podjąć po kilku miesiącach, kiedy wątroba niemowlęcia osiągnie dojrzałość w procesach syntezy czynników krzepnięcia [7].

W procesie rozpoznawania Hem B niekiedy sięga się po badanie zawartości (antygeny) fIX (FIX:Ag, *fIX antigen*) [6]. Do oceny FIX:Ag najczęściej wykorzystuje się metodę immunoenzymatyczną

(ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*). Test ten jest przydatny zwłaszcza do różnicowania defektu ilościowego od jakościowego w niedoborze fIX. Oblicza się stosunek aktywności do zawartości fIX w osoczu i przyjmuje, że przy wartości fIX:C/fIX:Ag poniżej 0,7 przyczyną Hem B jest defekt jakościowy czynnika IX, zaś przy wartości fIX:C/fIX:Ag większej lub równej 0,7 — defekt ilościowy. W większości przypadków Hem B obserwuje się defekt jakościowy.

U niektórych pacjentów z rozpoznaną w dzieciństwie ciężką, umiarkowaną lub łagodną Hem B obserwuje się wzrost aktywności i zawartości fIX w osoczu przez lata. Zjawisko to po raz pierwszy opisano w 1970 roku, a ten szczególny typ Hem B nazwano hemofilią B typu Leyden (Hem B Leyden) [11]. Ta niezwykła kompensacja stężenia fIX w osoczu pacjenta z Hem B jest wynikiem wzrostu stężenia androgenów w okresie dojrzewania płciowego mężczyzny, którego następstwem jest intensyfikacja transkrypcji fIX i trwale zwiększenie aktywności i zawartości fIX w osoczu. Wzrost fIX:C w Hem B Leyden jest zróżnicowany u poszczególnych osób i niezależny od typu mutacji sprawczej. Stężenie fIX może wzrosnąć o kilka lub kilkanaście $\mu\text{g}/\text{dl}$, a nawet osiągnąć wartości prawidłowe i wówczas objawy skazy krwotocznej całkowicie ustępują.

Podłoże molekularne i mutacje sprawcze Hem B

Rozwój molekularnych metod badawczych w ostatnich latach spowodował, że obecnie uważa się, że diagnostyka Hem B powinna obejmować zarówno badania koagulacyjne, jak i genetyczne [9, 10]. Podstawowym celem prowadzenia badań genetycznych w Hem B jest identyfikacja mutacji sprawczej w rodzinach dotkniętych chorobą, poznanie drogi dziedziczenia zmutowanego genu w rodzinie oraz potwierdzenie lub wykluczenie stanu nosicielstwa [7]. Poza tym poznanie mutacji sprawczej u chorych na Hem B umożliwia wstępną ocenę ryzyka wystąpienia alloprzeciwciał (inhibitora) fIX w odpowiedzi na wstrzykiwany dożylnie koncentrat czynnika IX, co może pomóc w wyborze optymalnej, zindywidualizowanej strategii leczenia.

Ludzki gen czynnika IX (*F9*) sklonowano w 1983 roku, zaś 2 lata później poznano pełną jego sekwencję DNA (NM_000133.3) [12]. Gen *F9* (Gene ID: 2158) znajduje się na długim ramieniu chromosomu X (*locus* q27.1-q27.2) w odległości około 15 mega par zasad (mpz) od genu czynnika VIII (*F8*) [13]. Jest zbudowany z 33,5 tys. par zasad (kpz, *kilo par zasad*), zaś jego transkrypt ma

wielkość około 2,8 kpz. DNA kodujące informację genetyczną reprezentuje osiem eksonów, z których największym jest ekson 8 (1,9 kpz).

Podobnie jak w Hem A, molekularne mechanizmy odpowiedzialne za wystąpienie Hem B są dość dobrze poznane. Konsekwencją mutacji w *F9* jest brak syntezy, jej ograniczenie bądź powstanie nieprawidłowego białka. Zależnie od tego wyróżnia się mutacje typu I (historycznie zwane CRM–, *cross reacting material negative*) oraz typu II (CRM+, *cross reacting material positive*) [14]. Mutacje typu I wywołują defekt ilościowy fIX spowodowany, na przykład, nieprawidłowościami w transkrypcji, sekrecji lub stabilności białka, zaś mutacje typu II wywołują defekt jakościowy fIX (upośledzenie funkcji przy prawidłowej lub zmniejszonej zawartości) wywołany, na przykład, ograniczeniem aktywności katalitycznej enzymu [6, 14]. W odróżnieniu od innych skaz krwotocznych, Hem B w większości przypadków (ok. 60%) jest wywołana mutacjami typu II, które najliczniej występują w domenie SP [10]. Cięższy przebieg kliniczny choroby wiąże się z wariantami *F9*, w których dochodzi do utraty większego fragmentu genu lub przedwczesnego wprowadzenia do sekwencji kodonu „stop” (tzw. *null mutation*), ponieważ prowadzi to do skrócenia łańcucha białkowego fIX.

Pierwszą mutację punktową w genie *F9* (c.723+1G>T) zidentyfikowano w 1985 roku [15]. Do tej pory w genie *F9* wykryto ponad 1000 różnych mutacji sprawczych, które są zebrane w internetowych bazach mutacji, na przykład w Bazie Mutacji Genetycznych Człowieka (HGMD, *The Human Gene Mutation Database*; www.hgmd.org) oraz w Bazie Wariantów Genetycznych (fIX, *factor IX Variant Database*; <http://www.factorix.org/>). W odróżnieniu od Hem A, w której mutacje inwersyjne w *F8* identyfikuje się u blisko 50% chorych, w Hem B brakuje równie często wykrywanych mutacji. Najczęściej (74% wszystkich mutacji) wykrywa się podstawienia pojedynczych nukleotydów — mutacje zmiany sensu (75%) i mutacje nonsensowne (11%), rzadziej splicingowe (11%) i inne (3%) [14]. Pozostałe identyfikowane zmiany (26% wszystkich mutacji) w *F9* to małe (< 50 pz) delecje (17%), duplikacje (1%) lub insercje (4%) oraz większe (> 50 pz) rearanżacje genowe (4%). Bez względu na rodzaj mutacji sprawczej największa ich liczba (46%) jest identyfikowana w eksonie 8 genu *F9* (domena SP), co także tłumaczy największą liczbę budujących go nukleotydów (1935 pz) [14].

W piśmiennictwie można znaleźć doniesienia o wykryciu u tego samego pacjenta z Hem B więcej niż jednej mutacji sprawczej w *F9* [16, 17]. W więk-

szości opisywano współistnienie dwóch różnych defektów odpowiedzialnych za Hem B, ale istnieją także doniesienia o współistnieniu trzech lub czterech, aczkolwiek wówczas nasuwają się wątpliwości co do ich patogennego wpływu na fIX [10]. W bazie Wariantów Genetycznych fIX, na ponad 3700 doniesień, blisko 50 (ok. 1%) dotyczy pacjentów z wielokrotnymi mutacjami w *F9* [10]. W badaniu przeprowadzonym przez Ghosh i wsp. [16] wśród 103 pacjentów z Hem B u 8 (8%) z ciężkim przebiegiem skazy wykryto podwójne mutacje w *F9*. Ze względu na małą skalę opisywanego zjawiska trudno oszacować jego znaczenie patofizjologiczne i kliniczne.

W genie *F9* identyfikowano zarówno unikatowe zmiany, występujące u pojedynczych chorych, jak i często powtarzające się mutacje (np. c.1025C>T;p.Thr324Met) [10, 14]. Te często powtarzające się zmiany polegają przeważnie na podstawieniu CG na TG lub CA w hipermutagennych obszarach DNA bogatych w cytozynę i guaninę (tzw. wyspach CpG) [18]. Szacuje się, że mutacje założycielskie (*founder mutations*) odpowiadają za wystąpienie 20–30% przypadków łagodnej Hem B, a identyfikowano je między innymi w Wielkiej Brytanii (c.520+13A>G), Stanach Zjednoczonych (c.1328T>C) i Irlandii (c.-35G>A) [6].

W 2009 roku, badając szczątki członków rodziny carskiej odnalezione w tak zwanym, „drugim grobie” w Jekaterynburgu, wykazano, że mutacją odpowiedzialną za występowanie Hem B w królewskich rodzinach Europy była substytucja A>G zlokalizowana w intronie 3 genu *F9* (c.278-3A>G), powodująca przesunięcie ramki odczytu mRNA i wygenerowanie kodonu „stop” [19]. Co ciekawe, wyniki badań z lat 2007–2009 potwierdziły obecność w grobie szczątków całej rodziny carskiej, w tym siostry carewicza — Anastazji, u której wykazano obecność takiej samej mutacji w *F9*, jak u najsłynniejszego chorego na Hem B.

W regionie promotora *F9* do mutacji dochodzi stosunkowo rzadko (ok. 2% wszystkich wykrytych wariantów), jednak identyfikacja pewnych zmian w tym regionie ma szczególne znaczenie kliniczne, gdyż odpowiada za wystąpienie wcześniej wspomnianej Hem B typu Leyden. W 1988 roku po raz pierwszy określono wariant *F9* odpowiedzialny za Hem B Leyden u holenderskich pacjentów, a obecnie w Bazie Wariantów Genetycznych fIX znajduje się 13 różnych wariantów [20]. Zarejestrowane mutacje dotyczą specyficznych miejsc wiążących czynnik transkrypcyjny w regionie promotora (5'UTR), zlokalizowanych w sekwencji DNA między –50 a –5 nukleotydem przed kodonem starto-

wym (ATG). Mutacje powodujące Hem B Leyden wykrywano zarówno w ciężkiej, umiarkowanej, jak i łagodnej postaci Hem A [14].

Poza wariantami patogennymi (mutacjami) w *F9* wykryto ponad 50 synonimicznych (np. p.Glu193Glu, p.Gly246Gly, p.Val359Val) i niesynonimicznych (np. p.Arg3His, p.Ile7Phe, p.Ala194Thr) wariantów polimorficznych (SNP, *single nucleotide polymorphism*) [14]. Warianty te są często występującymi (>1%) w populacji substytucjami pojedynczych nukleotydów, które nie przyczyniają się do wystąpienia objawów choroby.

Przyczyną ponad 50% przypadków zachorowań na Hem B są mutacje pojawiające się w rodzinie *de novo* i najczęściej są to mutacje germinalne [21]. Spontaniczne powstawanie tych mutacji wiąże się głównie z podziałem mejotycznym spermatocytów, zaś około 8-krotnie rzadziej dochodzi do nich w czasie podziału żeńskich komórek rozrodczych [6, 22]. Prawdopodobną przyczyną tego zjawiska upatruje się w obecności pojedynczej kopii chromosomu X i „osłabionym” w związku z tym mechanizmie naprawczym DNA bądź znacznie większej liczebności męskich komórek rozrodczych uczestniczących w zapłodnieniu żeńskiej komórki jajowej [6]. Oznacza to, że pierwszą osobą w rodzinie posiadającą zmutowany gen Hem B jest córka mężczyzny, w którego komórkach rozrodczych doszło do mutacji [22].

Mutacje sprawcze Hem B a ryzyko wystąpienia inhibitora

Pojawienie się w krwiobiegu alloprzeciwciał neutralizujących fIX (tzw. inhibitora fIX) jest istotnym powikłaniem leczenia substytucyjnego Hem B. Ich powstawaniu mogą sprzyjać zarówno uwarunkowania genetyczne (typ mutacji sprawczej Hem B), jak i czynniki środowiskowe. Inhibitor wobec niedoborowego czynnika krzepnięcia występuje w Hem B ponad 10-krotnie rzadziej (1–3% chorych) niż w Hem A (ok. 30% chorych). Alloprzeciwciała wobec fIX wielokrotnie częściej pojawiają się w ciężkiej Hem B niż w Hem B umiarkowanej i łagodnej. Najwyższe, bo około 50-procentowe, ryzyko wystąpienia inhibitora fIX obserwuje się u chorych, u których Hem B jest spowodowana obecnością rozległych delecji; znacznie niższe ryzyko wystąpienia inhibitora dotyczy pacjentów z Hem B spowodowaną mniejszymi delecjami bądź mutacjami nonsensowymi [14, 23, 24].

Mutacje nonsensowne w sekwencji DNA prowadzą do powstawania kodonu „stop” i przedwczesnego zakończenia syntezy polipeptydu, choć

mogą także powodować niestabilność mRNA. Pinotti i wsp. [25] uzyskali bardzo ciekawe wyniki badań ekspresji *F9 in vitro* kilku dość często wykrywanych mutacji nonsensownych, mianowicie p.Arg162X, p.Arg294X i p.Arg298X. W badaniach tych wykazano syntezę pełnołańcuchowego fIX w stężeniu poniżej 5%. Synteza fIX, mimo pojawienia się kodonu „stop”, prawdopodobnie wynika z niedoskonałości procesu terminacji translacji białka i rybosomalnego odczytywania (*ribosome readthrough*) kodonów mRNA, mimo obecności kodonu nonsense. Wyniki dalszych badań dowiodły, że Hem B wywołana tymi mutacjami może zwiększać ryzyko rozwoju inhibitora fIX [26].

Niskie ryzyko wystąpienia inhibitora fIX wiąże się z obecnością mutacji zmiany sensu w *F9*; tylko w 2 przypadkach mutacji zlokalizowanych w eksonie 6 (c.709C>A; p.Gln237Lys oraz c.723G>C; p.Gln241His) zaobserwowano pojawienie się inhibitora fIX [10, 14].

Ponadto uważa się, że rodzaj mutacji sprawczej Hem B może odgrywać rolę w powstawaniu reakcji anafilaktycznej, którą obserwuje się niekiedy u chorych na Hem B powikłaną inhibitorem fIX [27]. Analiza genetyczna przeprowadzona wśród 8 pacjentów z Hem B i epizodem reakcji anafilaktycznej przez Thorland i wsp. [24] wykazała, że najwyższe ryzyko wystąpienia tego powikłania obserwowano u pacjentów z „ciężkimi” defektami genetycznymi (zwłaszcza z dużymi delecjami genowymi) i tak zwanymi mutacjami typu „zero” (*null*).

Metody molekularne wykorzystywane w diagnostyce Hem B

Metodą z wyboru w poszukiwaniu mutacji sprawczych w *F9* jest bezpośrednie sekwencjonowanie DNA [9]. Najczęściej sekwencjonowanie *F9*, obejmujące promotor i regiony kodujące (8 eksonów) wraz z oskrzydłającymi je sekwencjami intronowymi, przeprowadza się metodą Sangera [10].

W niektórych laboratoriach (w celu zmniejszenia kosztów) do wykrywania mutacji punktowych wykorzystuje się przesiewowe metody molekularne, jak na przykład polimorfizm konformacji pojedynczych nici DNA (SSCP, *single strand conformation polymorphism*), analizę elektroforetyczną rozróżniającą konformację DNA (CSGE, *conformation sensitive gel electrophoresis*) lub wysokosprawną denaturującą chromatografię cieczową (DHPLC, *denaturing high-performance liquid chromatography*) [9]. Procedury te pomagają wstępnie zlokalizować zmianę w *F9*, która następnie jest identyfikowana metodą bezpośredniego sekwencjonowania.

Sekwencjonowanie DNA pozwala na wykrycie pojedynczych zmian nukleotydów, małych insercji i delecji, lecz poza jej zasięgiem jest określenie dużych rearanżacji genowych (np. delecji czy insercji fragmentu genu) [6]. W celu identyfikacji większych defektów w *F9* najczęściej wykorzystuje się technikę multipleksowej amplifikacji sond, zależnej od ligacji (MLPA, *multiplex ligation-dependent probe amplification*), która jest przeznaczona do wykrywania zmiany liczby kopii DNA, tj. delecji lub duplikacji fragmentu lub wielu eksonów [10]. Amplifikacja sekwencji nukleotydowych DNA z użyciem zestawu specyficznych sond hybrydujących do sekwencji eksonowych (np. SALSA MLPA P207 *F9*; MRC-Holland) umożliwia w jednym badaniu ilościową ocenę kilkudziesięciu różnych fragmentów *F9*.

Dawniej niedoskonałości stosowanych technik oraz heterogenność mutacji w *F9* powodowały, że do określania nosicielstwa Hem B wykorzystywano pośrednie metody diagnostyczne [10]. Najczęściej analizowano dziedziczenie haplotypów sprzężonych z chorobą (*linkage analysis*), wykorzystując reakcję łańcuchowej amplifikacji w połączeniu z analizą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (PCR-RFLP, *restriction fragment length polymorphism*) [6, 28]. Istotnym ograniczeniem tej metody, a zarazem warunkiem uzyskania informatywnego wyniku, jest jednoczesna analiza próbki DNA probanta. Dziś w większości laboratoriów korzysta się z bezpośrednich metod molekularnych, jednak w sytuacjach, w których mimo zastosowania dostępnych narzędzi molekularnych nie udaje się wykryć mutacji sprawczej w rodzinie dotkniętej Hem B, ciągle znajduje zastosowanie analiza sprzężeń [9].

W diagnostyce hemofilii (zarówno B, jak i A) coraz częściej sięga się również po inne, bardziej nowoczesne techniki molekularne, tj. sekwencjonowanie nowej generacji (NGS, *next generation sequencing*) oraz porównawczą hybrydyzację genomową do mikromacierzy (aCGH, *array comparative genomic hybridisation*) [29, 30]. Ogromną zaletą NGS jest możliwość jednoczesowej analizy wielu genów, eksomu lub nawet całego genomu człowieka, zaś wadą — wysoki koszt. Technika aCGH również umożliwia analizę całego genomu w jednym badaniu z dość dużą dokładnością i, podobnie jak MLPA, służy głównie do wykrywania niechrónoważeń genomu (delecji/duplikacji).

Raportowanie wyników badań genetycznych w Hem A i Hem B powinno być zgodne z obowiązującymi zasadami nazewnictwa mutacji opracowanymi przez HGVS (*Human Genome Variation Society*; www.hgvs.org/mutnomen/), przyjmując za nukleo-

tyd +1 w cDNA pierwszy nukleotyd w kodonie startowym (A, czyli adenina w kodonie ATG), zaś za kodon +1 w sekwencji białkowej — metioninę [14, 31]. W zapisach mutacji wykrytych w *F9* przed wprowadzeniem obecnie obowiązujących zasad należy je uwzględnić, dodając 46 reszt aminokwasowych do pozycji zmutowanego kodonu [14].

Strategia przeprowadzania badań molekularnych w Hem B

Postępowanie diagnostyczne zależy przede wszystkim od tego, czy w badanej rodzinie uprzednio poznano mutację odpowiedzialną za wystąpienie choroby. Jeżeli mutacja sprawcza została określona, to sekwencjonowanie *F9* jest ukierunkowane na wykrycie właśnie tego wariantu (amplifikacja pojedynczego fragmentu genu). W przeciwnym razie konieczne jest sekwencjonowanie całego genu *F9* (promotora i 8 eksonów), co oczywiście znacznie zwiększa koszt analizy. Jeżeli metodą sekwencjonowania nie uda się zidentyfikować mutacji sprawczej, to w kolejnym etapie należy poszukiwać w *F9* większych rearanżacji (np. techniką MLPA). Opisany algorytm dotyczy zarówno diagnostyki molekularnej ciężkiej Hem B, jak i postaci nieciężkich.

Warto podkreślić, że w przypadku badania nosicielstwa hemofilii u kobiet zaleca się rozpoczynanie diagnostyki molekularnej w rodzinie od określenia mutacji sprawczej u chorego mężczyzny i dopiero na podstawie uzyskanego u niego wyniku poszukiwanie obecności mutacji sprawczej u badanej kobiety.

Trudności w interpretacji wyników badań genetycznych

Interpretacja wyniku badania genetycznego jest jednoznaczna, jeżeli u pacjenta zidentyfikowano wariant *F9* wcześniej już opisany i sklasyfikowany jako mutacja sprawcza Hem B. Trudności pojawiają się w przypadku wykrycia wariantu dotychczas nieznanego, gdyż wówczas trudno odpowiedzieć jednoznacznie na pytanie, czy wariant ten jest odpowiedzialny za wystąpienie choroby, czy też jest wariantem polimorficznym. Pomocne jest wtedy korzystanie z różnych narzędzi bioinformatycznych (metod *in silico*), ale w większości laboratoriów nie ma możliwości przeprowadzenia badań funkcjonalnych zmienionego białka.

Prowadząc badania genetyczne, w których analizowanym materiałem jest DNA izolowane z limfocytów krwi obwodowej, nie można wykluczyć dość rzadko występującego zjawiska mozaikowości somatycznej lub germinalnej [9, 10, 27]. Fakt

ten należy uwzględnić, interpretując wyniki badań w kierunku nosicielstwa hemofilii u kobiet oraz w diagnostyce mężczyzn z łagodną i umiarkowaną postacią skazy (zwłaszcza w sytuacji sporadycznego występowania Hem B w rodzinie). W piśmiennictwie scharakteryzowano pojedyncze przypadki mozaikowości somatycznej w Hem B, w których mutacja sprawcza u matki nosicielki była obecna jedynie w części DNA komórek krwi obwodowej [32]. O istnieniu mozaikowości w gonadach kobiety można pośrednio domniemywać, jeżeli mimo negatywnego wyniku nosicielstwa hemofilii w badaniu z komórek somatycznych matki chorego chłopca kobieta rodzi drugiego syna chorego na hemofilię. Również u mężczyzn z łagodną i umiarkowaną Hem B, którzy są pierwszymi w rodzinie osobami chorymi na hemofilię, możliwe jest występowanie mozaikowości. Co ciekawe, w takiej sytuacji nie można wykluczyć, że przekazanie genu hemofilii wnukowi może się wiązać z nasileniem u niego objawów skazy krwotocznej [33].

Badania prenatalne w Hem B

Diagnostyka prenatalna stanowi integralną część opieki nad nosicielkami Hem B. Polega ona na uzyskaniu próbki DNA płodu albo za pomocą biopsji trofoblastu w 11.–14. tygodniu ciąży, albo w amniopunkcji przeprowadzanej w 15.–18. tygodniu ciąży [10, 34]. Inną opcją jest wykonanie kordocentezy (po 18. tygodniu ciąży) i pobranie krwi pępowinowej w celu zbadania aktywności *fIX*. Zasadność wykonywania inwazyjnych procedur u będących w ciąży nosicielek hemofilii jest przedmiotem licznych dyskusji ze względu na inwazyjność opisanych technik i związane z tym ryzyko uszkodzenia płodu oraz ryzyko wystąpienia krwawienia u matki [7]. Dodatkowym ograniczeniem kordocentezy jest fizjologicznie zmniejszona aktywność *fIX* u płodu; innymi słowy, procedura ta nie gwarantuje uzyskania informatywnego wyniku. Do badań prenatalnych zalicza się także analizę wolnego DNA pochodzenia płodowego we krwi obwodowej matki (*ffDNA*, *free fetal DNA*), umożliwiającą wczesne, bo już około 10. tygodnia ciąży, zidentyfikowanie płci dziecka, której znajomość ułatwia podjęcie dalszych decyzji diagnostyczno-terapeutycznych [10, 35, 36].

Badania genetyczne Hem B w Polsce

Obecnie badania genetyczne w diagnostyce Hem B są w Polsce trudno dostępne, co wynika przede wszystkim z braku refundacji kompleksowej diagnostyki hemofilii przez Narodowy Fundusz

Zdrowia. W 1999 roku Wulff i wsp. [37] opublikowali wyniki jedynych badań molekularnych Hem B w Polsce. Mutacje sprawcze zidentyfikowano u 47 spośród 53 (89%) włączonych do badania mężczyzn z ciężką, umiarkowaną i łagodną Hem B. Najczęściej wykrywanymi mutacjami były substytucje pojedynczych nukleotydów, z których 12 nie było uprzednio znanych. W Zakładzie Hemostazy i Chorób Metabolicznych IHT jest wdrażana procedura kompleksowej analizy molekularnej Hem B.

Piśmiennictwo

- Biggs R., Douglas A., Macfarlane R. i wsp. Christmas disease: a condition previously mistaken for haemophilia. *Br. Med. J.* 1952; 2: 1378–1382.
- Lascari A.D., Hoak J.C., Taylor J.C. Christmas disease in a girl. *Am. J. Dis. Child.* 1969; 117: 585–588.
- Windyga J., Łopaciuk S., Stefańska E. i wsp. Hemofilia i pokrewne skazy krwotoczne w Polsce. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2004; 112: 1197–1202.
- Spinelli A., Schmid W., Straub P.W. Christmas disease (haemophilia B) in a girl with deletion of the short arm of one X-chromosome (functional Turner syndrome). *Br. J. Haematol.* 1976; 34: 129–135.
- Krepisch-Santos A.C., Carneiro J.D. i wsp. Deletion of the factor IX gene as a result of translocation t(X;1) in a girl affected by haemophilia B. *Br. J. Haematol.* 2011; 13: 616–620.
- Gomez K., Chowdary P. Hemophilia B: molecular basis. W: Christine A., Lee C.A., Berntorp E.E., Hoots K.W. (red.). *Textbook of hemophilia*. Wydanie III. Wiley-Blackwell, Chichester 2014: 97–102.
- Windyga J. Hemofilia A i B. W: Dmoszyńska A. (red.). *Wielka Interna. Hematologia*. Wyd. Medical Tribune Polska, Warszawa 2011: 608–630.
- White G.C., Rosendaal F.R., Aledort L. Definitions in hemophilia. *Thromb. Haemost.* 2001; 85: 560.
- Mitchell M., Keeney S., Goodeve A. The molecular analysis of haemophilia B: a guideline from the UK haemophilia centre doctors' organization haemophilia genetics laboratory network. *Haemophilia* 2005; 11: 398–404.
- Goodeve A.C. Hemophilia B: molecular pathogenesis and mutation analysis. *J. Thromb. Haemost.* 2015; 13: 1184–1195.
- Veltkamp J.J., Meilof J., Remmelts H.G. i wsp. Another genetic variant of haemophilia B: haemophilia B Leyden. *Scand. J. Haematol.* 1970; 7: 82–90.
- Yoshitake S., Schach B.G., Foster D.C. i wsp. Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). *Biochemistry* 1985; 24: 3736–3750.
- Jenkins P.V., Keenan C., Keeney S. i wsp. Clinical utility gene card for: haemophilia B. *Eur. J. Hum. Genet.* 2012; 20.
- Rallapalli P.M., Kembal-Cook G., Tuddenham E.G. i wsp. An interactive mutation database for human coagulation factor IX provides novel insights into the phenotypes and genetics of hemophilia B. *J. Thromb. Haemost.* 2013; 11: 1329–1340.
- Rees D.J., Rizza C.R., Brownlee G.G. Haemophilia B caused by a point mutation in a donor splice junction of the human factor IX gene. *Nature* 1985; 316: 643–645.
- Ghosh K., Shetty S., Quadros L., Kulkarni B. Double mutations causing haemophilia B: a double whammy! *Br. J. Haematol.* 2009; 145: 433–435.
- Shetty S., Bhawe M., Ghosh K. Challenges of multiple mutations in individual patients with haemophilia. *Eur. J. Haematol.* 2011; 86: 185–190.
- Li T., Miller C.H., Driggers J. i wsp. Mutation analysis of a cohort of US patients with hemophilia B. *Am. J. Hematol.* 2014; 89: 375–379.
- Rogaev E.I., Grigorenko A.P., Faskhutdinova G. i wsp. Genotype analysis identifies the cause of the "royal disease". *Science* 2009; 326: 817.
- Reitsma P.H., Bertina R.M., Ploos van Amstel J.K. i wsp. The putative factor IX gene promoter in hemophilia B Leyden. *Blood* 1988; 72: 1074–1076.
- Kasper C.K., Lin J.C. Prevalence of sporadic and familial haemophilia. *Haemophilia* 2007; 13: 90–92.
- Kasper C.K., Buzin C.H. Mosaics and haemophilia. *Haemophilia* 2009; 15: 1181–1186.
- Radic C.P., Rossetti L.C., Abelleiro M.M. i wsp. Assessment of the F9 genotype-specific FIX inhibitor risks and characterisation of 10 novel severe F9 defects in the first molecular series of Argentinian patients with haemophilia B. *Thromb. Haemost.* 2013; 109: 24–33.
- Thorland E.C., Drost J.B., Lusher J.M. i wsp. Anaphylactic response to factor IX replacement therapy in haemophilia B patients: complete gene deletions confer the highest risk. *Haemophilia* 1999; 5: 101–105.
- Pinotti M., Caruso P., Canella A. i wsp. Ribosome readthrough accounts for secreted full-length factor IX in hemophilia B patients with nonsense mutations. *Hum. Mutat.* 2012; 33: 1373–1376.
- Branchinni A., Ferarrese M., Baroni M. i wsp. Suppression of 'leaky' nonsense mutations by ribosome readthrough accounts for residual factor IX levels in haemophilia B patients. *J. Thromb. Haemost.* 2015; 13: 209.
- Chitlur M.B., Lusher J.M. Factor IX inhibitors in hemophilia B. W: Christine A., Lee C.A., Berntorp E.E., Hoots K.W. (red.). *Textbook of hemophilia*. Wydanie III. Wiley-Blackwell, Chichester 2014: 103–106.
- Jayandharan G.R., Srivastava A., Srivastava A. Role of molecular genetics in hemophilia: from diagnosis to therapy. *Semin. Thromb. Hemost.* 2012; 38: 64–78.
- Goodeve A.C., Pavlova A., Oldenburg J. Genomics of bleeding disorders. *Haemophilia* 2014; 20: 50–53.
- Josephson N.C., Martin B., Nakaya S. i wsp. A next generation sequencing approach for genotyping patients with hemophilia. *J. Thromb. Haemost.* 2013; 11: 260–261.
- Odnoczek E., Windyga J. Badania genetyczne w diagnostyce hemofilii A. *Hematologia* 2014; 5: 193–202.
- Kim H.J., Lee K.O., Yoo K.Y. i wsp. Maternal low-level somatic mosaicism of Cys155Tyr of F9 in severe hemophilia B. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 2014 Nov 14 [złożone do druku].
- Cutler J.A., Mitchell M.J., Smith M.P., Savidge G.F. Germline mosaicism resulting in the transmission of severe hemophilia B from a grandfather with a mild deficiency. *Am. J. Med. Genet. A.* 2004; 129A: 13–15.
- Kadir R.A., Lee C.A. Obstetrics and gynecology: hemophilia. W: Christine A. Lee C.A., Berntorp E.E., Hoots K.W. (red.). *Textbook of hemophilia*. Wydanie III. Wiley-Blackwell, Chichester 2014: 269–277.
- Chi C., Hyett J.A., Finning K.M., Lee C.A., Kadir R.A. Non-invasive first trimester determination of fetal gender: a new approach for prenatal diagnosis of haemophilia. *BJOG* 2006; 113: 239–242.
- Peyvandi F., Garagiola I., Mortarino M. Prenatal diagnosis and preimplantation genetic diagnosis: novel technologies and state of the art of PGD in different regions of the world. *Haemophilia* 2011; 17: 14–17.
- Wulff K., Bykowska K., Łopaciuk S., Herrmann F.H. Molecular analysis of hemophilia B in Poland: 12 novel mutations of the factor IX gene. *Acta Biochim. Pol.* 1999; 46: 721–726.